

欧盟鱼病水平测试样品中 DNA 病毒检测

徐 晔, 段宏安*, 周 毅, 丁 超 (连云港出入境检验检疫局, 江苏连云港 222042)

摘要 [目的]通过参加欧盟鱼病水平测试,评价实验室检测能力,加强对检测方法的掌握。[方法]按照水平测试说明的方法进行病毒分离鉴定,测试的10个样品在病毒分离后用PCR方法检测DNA病毒。[结果]PTII检测为流行性造血器官坏死病毒(Epizootic haematopoietic necrosis virus, EHN), PTIII为欧洲鲢病毒(European catfish virus, ECV), PTVIII和PTX为锦鲤疱疹病毒(Koi herpesvirus disease virus, KHDV), PTIX为流行性溃疡综合征(Epizootic ulcerative syndrome, EUS)。[结论]该实验室检测出了2011年欧盟鱼病水平测试样品中的4种DNA病毒,与最后公布的测试结果完全一致。

关键词 鱼病水平测试; DNA病毒; 欧盟

中图分类号 S941 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2012)34-16624-03

Detection of DNA Virus in the Inter-laboratory Proficiency Test

XU Ye et al (Lianyungang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Lianyungang, Jiangsu 222042)

Abstract [Objective] By participating the European Union inter-laboratory proficiency test for fish diseases, the detectability of the laboratory was evaluated and the master of the detection method was improved. [Method] Ten proficiency test samples were detected by virus isolation and identification according to the instruction of the proficiency test. [Result] The PT II was epizootic haematopoietic necrosis virus (EHN), the PT III was European catfish virus (ECV), the PT VIII and PT X were both koi herpesvirus disease virus (KHDV), the PT IX was epizootic ulcerative syndrome (EUS). [Conclusion] Four types of DNA virus were detected positive from the proficiency test samples, which was consistent with the final results.

Key words Proficiency test for fish disease; DNA virus; European

我国是渔业大国,同时也是养殖大国和水产品出口大国。水产品出口贸易随着养殖业的迅速发展而日益繁荣,某些水产养殖产品或其加工产品主要用于出口。随着国际贸易的开展,新的养殖品种不断被引进,造成养殖病害频繁发生,每年病害均造成重大经济损失。20世纪末北京出口英国的观赏鱼被检出SVCV,英国将我国划为疫区,中断贸易达半年以上。因此,水生动物检疫工作对于养殖业的健康持续发展、维护国际贸易的正常秩序具有重要意义^[1]。

检疫实验室作为防疫的技术保障措施之一,应加强建设^[1]。为了加强技术交流,提高检测水平,连云港出入境检验检疫局水生动物检疫实验室从2008年起连续4年参加了由丹麦国家兽医研究所(EURL)组织的鱼病水平测试,对列入OIE手册的鱼病进行检测。该水平测试是一种诊断程序的比较试验。该试验分为2个水平测试,即水平测试1(PT1)和水平测试2(PT2)。EURL在前几年的水平测试中只设计了PT1,主要用于评估参加测试的实验室鉴定病毒性出血性败血症病毒、传染性造血器官坏死病毒和流行性造血器官坏死病毒等鱼类病毒的水平。2010年首次增加了PT2,旨在评估参加测试实验室鉴定传染性鲑鱼贫血病病毒和锦鲤疱疹病毒的能力,2011年在PT2样品中又增加了流行性溃疡综合征的检测^[2]。连云港出入境检验检疫局水生动物检疫实验室于2011年11月参加了水平测试,包含PT1和PT2 2个部分,各有5个安瓿管,共10个测试样品,按照水平

测试说明对PT1样品进行了蛙病毒检测,使用常规PCR或实时荧光PCR方法对PT2样品进行了KHV检测,并使用常规PCR方法对PT2样品进行了流行性溃疡综合征的病原(丝囊霉菌)检测,旨在为提高该实验室检测水平提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 Taq DNA聚合酶购自上海生工生物公司。GeneQuant pro核酸浓度测定仪,美国GE医疗集团生产;SIGAMA 3K15型高速台式离心机,德国Sigma公司生产;Veriti PCR仪,美国ABI公司生产。

1.2 方法

1.2.1 样品处理。将PT1和PT2样品中的10支安瓿管分别标记为PTI~PTX。其中PTI样品中每管等体积分装了0.2 ml含20%(W/V)乳白蛋白水解产物的细胞上清冻干粉,用于病毒分离、滴定和鉴定;PT2样品中每管包含0.2 ml细胞培养物上清/milliQ水和0.2 ml 20%(W/V)乳白蛋白水解产物水溶液共0.4 ml溶液做成的冻干粉。按照水平测试说明,如果收到样品后无法立即开始检测,需将样品避光保存于4℃。

1.2.2 引物合成。按照OIE水生动物疾病诊断手册^[2],由上海生工生物公司合成引物(表1)。

1.2.3 锦鲤疱疹病毒检测。使用Bercovier TK引物^[3],对每个样品制备反应混合液:10×PCR反应缓冲液10.00 μl, MgCl₂ (25 mmol/L) 5.00 μl, dNTPs (25 mmol/L) 0.50 μl, 正、反向引物(100 pmol/μl)各0.50 μl, DNA聚合酶0.25 μl, 分子生物学级纯水30.75 μl。反应程序:94℃ 5 min; 95℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共40个循环;最后72℃延伸10 min。取10 μl PCR产物在2%琼脂糖凝胶上以120 V电压电泳30 min,紫外线下观察。使用Gray Sph引物^[4-5],对每个样品制备以下PCR反应液:10×PCR反应缓冲液2.00

基金项目 质检公益项目(201110037);国家质检总局科技计划项目(2010IK014);江苏检验检疫局科研项目(2007KJ01)。

作者简介 徐晔(1982-),女,江苏连云港人,中级兽医师,硕士,从事水生动物检疫研究。*通讯作者,研究员,博士,硕士生导师,从事水生动物检疫研究, E-mail: honganduan@yahoo.com.cn。

收稿日期 2012-09-18

μl , MgCl_2 的终浓度为 2 mmol/L, dNTPs (25 mmol/L) 1.60 μl , 正、反向引物 (50 pmol/ μl) 各 0.20 μl , DNA 聚合酶 0.10 μl , 分子生物学级纯水 14.90 μl 。反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 63 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。

表 1 引物序列

PCR 检测	引物	序列	产物大小//bp
锦鲤疱疹病毒 (Bercovier TK 引物对)	TKF	5'-GGGTTACCTGTACGAG-3'	321
	TKR	5'-CACCCAGTAGATTATGC-3'	
锦鲤疱疹病毒 (Gray Sph 引物对)	SphF	5'-GACACCACATCTGCAAGGAG-3'	409
	SphR	5'-GACACATGTTACAATGGTCGC-3'	
流行造血器官坏死病	EHNVF	5'-CGCAGTCAAGGCCTTGATGT-3'	580
	EHNVR	5'-AAAGACCCGTTTTGCAGCAAAC-3'	
流行性溃疡综合征 (Ainvad 引物对)	Ainvad-2F	5'-TCATTGTGAGTGAAACGGTG-3'	234
	Ainvad-ITSR1	5'-GGCTAAGGTTTCAGTACTATGTAG-3'	
流行性溃疡综合征 (ITS 引物对)	ITS11	5'-GCCGAAGTTTCGCAAGAAAC-3'	550
	ITS23	5'-CGTATAGACACAAGCACACCA-3'	

1.2.4 流行性造血器官坏死病毒检测。采用一轮 MCP PCR 扩增 580 bp 的产物^[6], 通过测序可鉴定蛙病毒的种类。反应体系: 核酸 1.0 μl , 上、下游引物各 1 $\mu\text{mol/L}$, *Taq* 酶 2.5 U, MgCl_2 2.5 mmol/L。混合物在自动热循环仪中按设定的程序运行 35 个循环, 即 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 15 min。扩增的 DNA (580 bp) 通过琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.5 流行性溃疡综合征检测。Ainvad-2F 和 Ainvad-ITSR1 反应总体积为 50.0 μl 的 PCR 反应体系包括: 上、下游引物各 25 pmol/L, 0.5 U *Taq* DNA 聚合酶和 20 ng 基因组 DNA。扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2.5 min, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。目标产物大小为 234 bp^[7]。

ITS11 和 ITS23 反应总体积为 25.0 μl 的 PCR 反应体系包括: 上、下游引物各 0.5 $\mu\text{mol/L}$, MgCl_2 1.5 mmol/L, 0.6 U *Taq* DNA 聚合酶和 20 ng 基因组 DNA。扩增程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 25 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。目标产物大小为 550 bp^[8]。

2 结果与分析

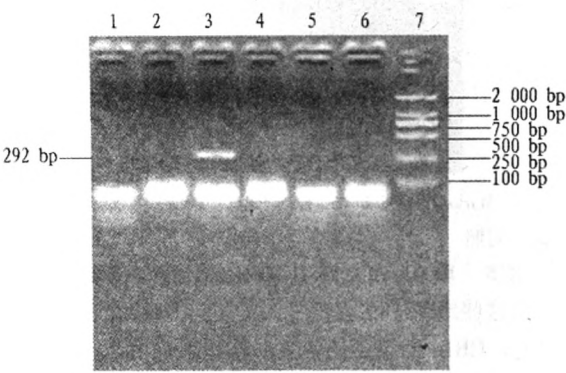
2.1 PT2 样品检测锦鲤疱疹病毒 (KHDV) 使用 Gray Sph 引物对, PTⅧ和 PTX有大小为 292 bp 的目的条带 (图 1); 使用 Bercovier TK 引物对, PTⅧ和 PTX有大小为 409 bp 的目的条带 (图 2), 说明 PTⅧ和 PTX为 KHDV。

2.2 PT1 样品检测流行造血器官坏死病毒 (EHNV) 采用一轮 MCP PCR 进行扩增, 结果可见 PTⅡ和 PTⅢ有 580 bp 的目的条带 (图 3), 通过测序发现 PTⅡ与 EHNV 有 98% 的同源性, PTⅢ与欧洲鲷病毒 (ECV) 有 97% 的同源性。

2.3 PT2 样品检测流行性溃疡综合征 (EUS) 使用 Ainvad-2F 和 Ainvad-ITSR1 引物对, PTⅨ有大小为 550 bp 的目的条带 (图 4); 使用 ITS11 和 ITS23 引物对, PTⅨ有大小为 234 bp 的目的条带 (图 5)。

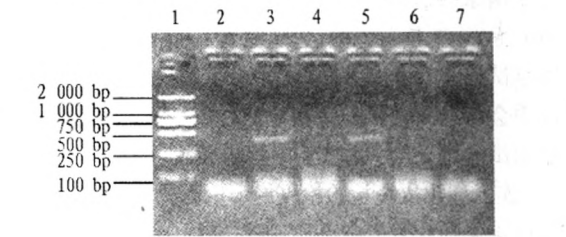
3 讨论

(1) 水平测试是评价试验室技术能力和比较测试结果的重要且实用的工具。接受 ISO/IEC 17025 认可的试验室必须定期参加水平测试从而改进分析技术。此外, 水平测试的客户或终端使用者, 例如欧盟委员会或其他权威机构能够从上



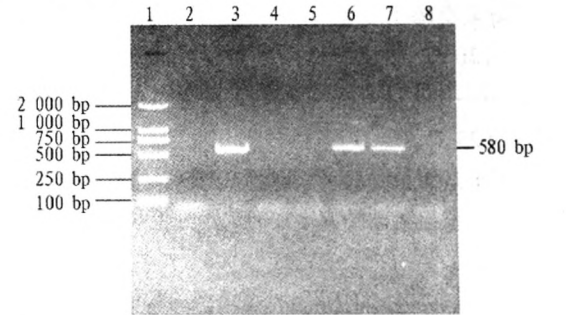
注: 1~5. KHDV PTⅧ ~ PTX 检测结果; 6. KHDV 阴性对照; 7. DL Marker 2000。

图 1 PTⅧ ~ PTX Gray Sph 引物对检测 KHDV 结果



注: 1. DL Marker 2000; 2. KHDV 阴性对照; 3~7. KHDV PTⅧ ~ PTⅨ检测结果。

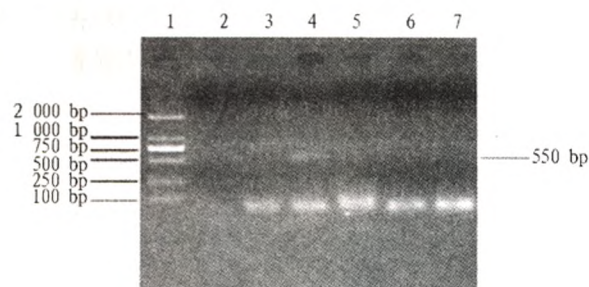
图 2 PTⅧ ~ PTX Bercovier TK 引物对检测 KHDV 结果



注: 1. DL Marker 2000; 2. EHNV 阴性对照; 3. EHNV 阳性对照; 4~8. EHNV PTⅡ ~ PTⅣ检测结果。

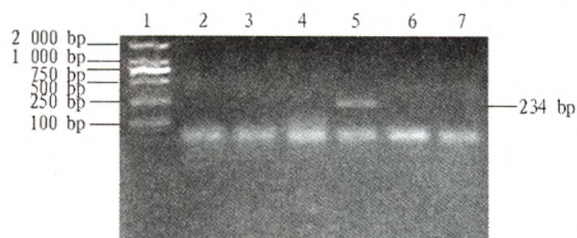
图 3 PTⅡ ~ PTⅣ EHNVF/R 引物检测 EHNV 结果

报的测试结果中获取对制定政策有用的信息^[9-10]。许多不同的私人机构和官方机构组织了检测各种化合物和基质的水平



注:1. DL Marker 2000; 2. EUS 阴性对照; 3~7. EUS PTX ~ PTX 检测结果。

图4 PTX ~ PTX Ainvad-2F/ITSR1 引物对检测 EUS 结果



注:1. DL Marker 2000; 2~6. EUS PTX ~ PTX 检测结果; 7. EUS 阴性对照。

图5 PTX ~ PTX ITS11/23 引物对检测 EUS 结果

测试。在这些组织中欧盟参考实验室(CRLs)是由欧盟委员会指定的。CRLs的主要任务之一就是组织由欧盟成员国的国家参考实验室(NRLs)参加的水平测试。

(2)欧盟鱼病水平测试是由欧盟委员会指定的实验室组织的由欧盟成员国的国家参考实验室(NRLs)参加的水平测试。丹麦国家兽医研究所是欧盟鱼病参考实验室(EURL),也是OIE鱼病参考实验室,它负责组织欧盟的鱼病水平测试。该测试给每个实验室一个对外保密的代码。在测试结果报告中会告知每个实验室相应的代码。另外,测试的组织者会根据试验结果给一些实验室提供建议。

(3)连云港出入境检验检疫局水生动物检疫实验室通过参加最近4年的欧盟鱼病水平测试,加强了对检测技术的掌握,从中也发现一些问题。首先,按照水平测试规定的方法处理样品,在打开安瓿管时需要用一边带有锯齿的锯条在管子的一侧锯出划痕,然后用纸巾包住掰开管子,按照该种方式管内的粉末会喷出少量,因而会降低起始样品中的病毒含量。另外,2011年的PT2样品应直接用于PCR或RT-PCR

检测,实际操作时样品被分出一部分用于接种敏感细胞,导致最后检测时样品量不足,有1种病毒未能检出。

(4)连云港出入境检验检疫局水生动物检疫实验室按照水平测试说明的方法进行病毒分离鉴定,测试的10个样品在病毒分离后用PCR方法检测DNA病毒。结果PTII检测为流行性造血器官坏死病毒(Epizootic haematopoietic necrosis virus, EHN),PTIII为欧洲鲶病毒(European catfish virus, ECV),PTVIII和PTX为锦鲤疱疹病毒(Koi herpesvirus disease virus, KHDV),PTIX为流行性溃疡综合征(Epizootic ulcerative syndrome, EUS),与最后公布的测试结果完全一致。根据欧盟鱼病水平测试的要求,鉴定待测病毒可使用ELISA、免疫荧光、中和试验、PCR/荧光PCR或RT-PCR/荧光RT-PCR方法进行,连云港出入境检验检疫局水生动物检疫实验室目前主要依赖于PCR/荧光PCR或RT-PCR/荧光RT-PCR方法,而免疫学方法都尚在建立过程中,还未用于日常检测,有待进一步开发利用。

参考文献

- [1] 陈爱平. 加快推进水生动物防疫步伐[J]. 中国水产, 2004(10): 41-43.
- [2] OIE. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2011 [K]. Office International des épizooties, 2011.
- [3] BERCOVIER H, FISHMAN Y, NAHARY R, et al. Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis [J]. BMC Microbiol, 2005, 5: 1-9.
- [4] YUASA K, SANO M, KURITA J, et al. Improvement of a PCR method with the Sph I-5 primer set for the detection of koi herpesvirus (KHV) [J]. Fish Pathol, 2005, 40: 37-39.
- [5] GRAY W L, MULLIS L, LAPATRA S E, et al. Detection of koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish [J]. J Fish Dis, 2002, 25: 171-178.
- [6] MARSH I B, WHITTINGTON R J, O'POURKE B, et al. Rapid differentiation of Australian, European and American ranaviruses based on variation in major capsid protein gene sequence [J]. Molec Cell Probes, 2002, 16: 137-151.
- [7] VANDERSEA M W, LITAKER R W, YONNISH B, et al. Molecular assays for detecting *Aphanomyces invadans* in ulcerative mycotic fish lesions [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72: 1551-1557.
- [8] PHADEE P, KURATA O, HATAI K, et al. Detection and identification of fish-pathogenic *Aphanomyces piscicida* using polymerase chain reaction (PCR) with species-specific primers [J]. J Aquat Anim Health, 2004, 16: 220-230.
- [9] POULSEN M E, CHRISTENSEN H B, HERRMANN S S, et al. Proficiency test on incurred and spiked pesticide residues in cereals [J]. Accred Qual Assur, 2009, 14: 477-485.
- [10] THOMPSON M, MATHIESON K, OWEN K, et al. The relationship between accreditation status and performance in a proficiency test [J]. Accred Qual Assur, 2009, 14: 73-78.

接添加于饲料中替代抗生素,用于日常动物保健。

参考文献

- [1] 戴清源, 陈祥贵, 李晓霞, 等. 溶菌酶的研究进展 [J]. 内蒙古农业科技, 2005(3): 14-16.
- [2] 叶丹, 连宾. 溶菌酶及其应用 [J]. 贵州科学, 2003, 21(3): 67-70.
- [3] HUYGHEBAERT G, 陈波摘. 肉鸡和产蛋鸡常用饲料中杆菌肽锌的生物学效价 [J]. 国外畜牧科技, 1998, 25(3): 27-28.
- [4] 丁亦男. 人重组溶菌酶对肉鸡生产性能及胴体品质的影响 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(28): 15677-15678.
- [5] 杨玉红, 张慧霞. 溶菌酶在畜牧业中的应用研究 [J]. 畜牧与饲料科学, 2008, 29(3): 49-50.

(上接第16623页)

其中添加黄霉素组最为显著,其次为0.2%人重组溶菌酶组。这说明添加人重组溶菌酶有增加肉鸡肠绒毛长度的效果。

3 讨论

试验表明,全期添加0.2%人重组溶菌酶的效果最好,可起到加快胃肠蠕动、促进食物消化、提高营养物质消化率的作用。这与Carre研究表明添加酶制剂后,使NSP的分子量减小,降低食糜黏度,从而减少回肠微生物发酵,为机体提供部分能量,相应改善动物的生产性能基本吻合。因此,人重组溶菌酶能够通过提高营养物质利用来促进肉鸡生长。直

欧盟鱼病水平测试样品中DNA病毒检测

作者: 徐晔, 段宏安, 周毅, 丁超
作者单位: 连云港出入境检验检疫局, 江苏连云港, 222042
刊名: 安徽农业科学 
英文刊名: Journal of Anhui Agricultural Sciences
年, 卷(期): 2012, 40(34)

参考文献(10条)

1. 陈爱平 加快推进水生动物防疫步伐[期刊论文]-中国水产 2004(10)
2. [OIE Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2011](#) 2011
3. [BERCOVIER H;FISHMAN Y;NAHARY R Cloning of the koi herpesvirus \(KHV\) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis](#) 2005
4. [YUASA K;SANO M;KURITA J Improvement of a PCR method with the Sph 1-5 primer set for the detection of koi herpesvirus \(KHV\)](#) 2005
5. [GRAY W L;MULLIS L;LAPATRA S E Detection of koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish](#) 2002
6. [MARSH I B;WHITTINGTON R J;OPOURKE B Rapid differentiation of Australian,European and American ranaviruses based on variation in major capsid protein gene sequence](#) 2002
7. [VANDERSEA M W;LITAKER R W;YON NISH B Molecular assays for detecting Aphanomyces invadans in ulcerative mycotic fish lesions](#) 2006
8. [PHADEE P;KURATA O;HATAI K Detection and identification of fish-pathogenic Aphanomyces piscicida using polymerase chain reaction \(PCR\) with species-specific primers](#) 2004
9. [POULSEN M E;CHRISTENSEN H B;HERRMANN S S Proficiency test on incurred and spiked pesticide residues in cereals](#) 2009
10. [THOMPSON M;MATHIESON K;OWEN K The relationship between accreditation status and performance in a proficiency test](#) 2009

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_ahnykx201234045.aspx